

Imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* u kopolimerne hidrogelove poli(*N*-izopropilakrilamid-*ko*-itakonska kiselina) sintetisane u prisustvu površinski aktivnih materija

Nikola Z. Milašinović, Nedeljko B. Milosavljević, Jovanka M. Filipović, Zorica D. Knežević-Jugović, Melina T. Kalagasis Krušić

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd, Srbija

Izvod

U radu je ispitana imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* u hidrogel poli(*N*-izopropilakrilamid-*ko*-itakonska kiselina) sintetisane u prisustvu nejonskih površinski aktivnih materija. Pri sintezi je varirana vrsta i sadržaj površinski aktivnih materija. Ispitana su mehanička svojstva sintetisanih hidrogelova i urađena je FT-IR analiza. Imobilizacija lipaze je izvedena bubrenjem prethodno sintetisanih hidrogelova u rastvoru lipaze, a zatim je ispitan uticaj dodatka površinski aktivnih materija pri sintezi nosača na kapacitet uklapanja lipaze u hidrogel i na aktivnost tako uklopljene lipaze. Imobilisana lipaza iz *Candida rugosa* je pokazala umanjenu hidrolitičku aktivnost, kako u odnosu na aktivnost slobodne lipaze, što je i očekivano, tako i u odnosu na aktivnost lipaze imobilisane u referentni hidrogel, sintetisan bez prisustva površinski aktivnih materija.

Ključne reči: nejonski surfaktanti; hidrogelovi; *N*-izopropilakrilamid; itakonska kiselina; aktivnost lipaze.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Lipaze (triacilglicerol acil-hidrolaze, E.C. 3.1.1.3) su enzimi koji imaju sposobnost da katalizuju cepanje karboksilne veze estara, tri-, di- i monoacilglicerola do glicerola i masnih kiselina. Nalaze se u organizmima životinja, biljaka i mikroorganizama u kojima igraju ključnu ulogu u metabolizmu lipida. Lipaze su od velikog značaja za industrijsku primenu. Koriste se za sintezu lekova i farmaceutskih hemikalija, u proizvodnji površinski aktivnih supstanci, kao i za dobijanje fiziološki aktivnih enantiomera izdvajanjem iz racemske smeše [1–3]. Lipaze se često primenjuju u organskim hemijskim procesima, proizvodnji detergenata, industriji ulja, mlečnoj industriji, agrohemijskoj industriji, proizvodnji papira, u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Česta upotreba lipaza omogućena je njihovom sposobnošću da deluju kao hidrolaze u vodenoj sredini i kao esteraze u sredinama bez ili sa vrlo malim sadržajem vode.

Veliki nedostatak u primeni lipaza je denaturacija i njihova nedovoljna stabilnost kako na operativne, tako i na uslove skladištenja i nemogućnost njihove regeneracije. Imobilizacijom enzima, na ili u čvrstu matricu, postiže se dodatna stabilnost enzima, poboljšanje pH i temperaturne stabilnosti uz sprečavanje denaturacije. Kovalentno vezivanje, obuhvatanje ili adsorpcija enzima su samo neke od mnogobrojnih tehnika imobilizacije enzima na različite nosače [4] i sa različitim moguć-

nostima primene. Pored stabilnosti, postiže se i ušteda u ceni samog procesa uz mogućnost višekratne upotrebe [5–7].

Idealna matrica za imobilizaciju ne bi trebalo da omogućava denaturaciju proteina. Takođe, trebalo bi da bude netoksična i da se relativno jednostavno sintetise u sterilnim uslovima. Razvoj hidrogelova kao matrica za imobilizaciju enzima već godinama privlači veliku pažnju naučne javnosti [8,9]. Na taj način se obezbeđuju blagi uslovi imobilizacije i zaštita enzima unutar hidrogela od štetnih uticaja iz spoljašnje sredine. Pri imobilizaciji enzim se smešta u hidrogel čija veličina pora treba da bude dovoljno velika da kroz nju mogu da difunduju molekuli supstrata i proizvoda reakcije, a da enzim ostaje unutar mreže. Pri tome je poželjno da enzim zadrži dovoljno visoku aktivnost nakon imobilizacije.

Lipaze su enzimi koji se javljaju u dve konformacije različite aktivnosti, od kojih je aktivnija otvorena konformacija. Zbog toga su istraživanja metoda imobilizacije lipaze usmerena na imobilizaciju pri kojoj će se održati lipaza u otvorenoj konformaciji. Ranija istraživanja su pokazala da površinski aktivne materije (PAM) aktiviraju lipaze, odnosno omogućavaju da se lipaza zadrži u aktivnijoj konformaciji. Prema tome, očekuje se da lipaze imobilisane u hidrogel u prisustvu PAM pokazuju poboljšanu biokatalitičku aktivnost usled povećane interakcije enzim–supstrat i olakšanog prenosa mase [10–15]. S druge strane, uticaj PAM na aktivnost lipaza može biti i negativan. Utvrđeno je da kriva zavisnosti aktivnosti enzima od koncentracije PAM prolazi kroz

NAUČNI RAD

UDK 66.095.261:678–13.547.462.3

Hem. Ind. 65 (6) 667–673 (2011)

doi: 10.2298/HEMIND110915063M

Prepiska: N.Z. Milašinović, Tehnološko–metalurški, Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: nikolla3@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 15. septembar, 2011

Rad prihvaćen: 20. septembar, 2011

maksimum, što znači da se za određene koncentracije PAM smanjuje aktivnost enzima. Dosadašnja istraživanja uglavnom su se bavila ispitivanjem uticaja kationskih i anjonskih PAM na aktivnost lipaze, za koje je potvrđeno da u većini slučajeva utiču na povećanje aktivnosti imobilisane lipaze [11,16]. U manjoj meri je ispitan uticaj nejonskih PAM i njihov uticaj na aktivnost lipaze [17].

Cilj ovog rada bio je da se lipaza iz *Candida rugosa* imobilizira u hidrogel poli(*N*-izopropilakrilamid-*ko*-itakonska kiselina) sintetisan u prisustvu nejonskih površinski aktivnih materija i ispita njena aktivnost nakon imobilizacije. U prethodnom radu [18] utvrđeno je da su najbolja svojstva hidrogela dobijena kada je sastav hidrogela sledeći: 90 mas% *N*-izopropilakrilamida, 10 mas% itakonske kiseline i 2 mas% umreživača. Zbog toga je za ovaj rad odabran taj uzorak, a pri sintezi je varirana vrsta (Triton X-100, Brij 30 i Tween 80) i sadržaj PAM. Imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* je izvedena potapanjem hidrogelova u rastvor lipaze. Ispitan je uticaj dodatka PAM pri sintezi nosača na kapacitet uklapanja lipaze u hidrogel i na aktivnost tako uklopljene lipaze. Na osnovu dobijenih rezultata odabran je biokatalizator optimalnog sastava koji bi mogao da se primeni kao katalizator u reakcijama koje se odigravaju u nevodnim sistemima.

EKSPERIMENTALNI DEO

Reaktanti

U ovom radu su korišćeni sledeći reaktanti: itakonska kiselina, IK (Fluka), *N*-izopropilakrilamid, NiPAAm (Acros), umreživač *N,N'*-metilenbisakrilamid, MBA (Serva), kalijum-persulfat, KPS, i kalijum-pirosulfat, KPYS (Merck), kao inicijator i ubrzivač reakcije polimerizacije, redom i lipaza iz *Candida rugosa*, tip VII (Sigma). Pre upotrebe, NiPAAm je prekrystalisan u smeši *n*-heksan/benzen (75/35). Ostali reaktanti su bili analitičke čistoće i korišćeni su bez prethodnog prečišćavanja.

Sinteza hidrogelova

Polimerizacijom preko slobodnih radikala na 25 °C sintetisani su kopolimerni hidrogelovi *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline. Vreme reakcije bilo je 48 sati. U nazivu uzorka prvi broj označava maseni udeo NiPAAm, drugi maseni udeo IK, a treći maseni udeo MBA. U sintetisanim hidrogelovima je sadržaj inicijatora i ubrzivača bio konstantan, i to 1 mas% računato na smešu monomera. Pri sintezama je variran sadržaj i vrsta površinski aktivnih materija. Korišćene su nejonske PAM Triton X-100, Brij 30 i Tween 80. Njihov sadržaj iznosio je 5, 10 i 20 mas% u odnosu na početnu smešu monomera. Sintetisano je 10 uzoraka, 9 u prisustvu PAM i jedan referentni uzorak bez PAM.

Odmerene mase reaktanata su rastvorene u odgovarajućoj zapremini destilovane vode. Svaki od reaktanata je rastvaran posebno. Rastvori su prođuvavani azotom 20 min, a zatim pomešani. Nakon toga je reakciona smeša izlivena u kalup napravljen od dve staklene ploče odvojene PVC crevom i ostavljena na 25 °C da polimerizuje. Nakon sinteze dobijeni hidrogelovi su isečeni u diskove i potopljeni u destilovanu vodu kako bi se odstranile neproreagovale materije, a voda je mešana svakodnevno tokom sedam dana. Potom su diskovi ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi u vakuumu do konstantne mase. Nakon određivanja sadržaja neproreagovanih materija utvrđeno je da je konverzija bila skoro kompletna.

Imobilizacija lipaze

Neposredno pre imobilizacije napravljen je osnovni rastvor za imobilizaciju enzima u fosfatnom puferu pH 7,00±0,01 čija je koncentracija bila 1 mg lipaze na 1 mL rastvora. Imobilizacija lipaze je izvedena metodom bubrenja, odnosno potapanjem suvih uzoraka (kserogelova) u 10 mL pripremljenog puferkog rastvora. Uzorci su ostavljeni da bubre do dostizanja ravnotežnog stepena bubrenja (48 h, utvrđeno iz rezultata bubrenja) na temperaturi od 5 °C uz često mešanje, kako bi se obezbedili uslovi maksimalnog upijanja lipaze iz rastvora.

Karakterizacija hidrogelova

Urađena je FT-IR analiza hidrogelova bez imobilisane lipaze iz *Candida rugosa*, korišćenjem Bomem MB 100 FT-IR spektrofotometra. Oko 2 mg uzorka se pomeša i sprži sa 100 mg kalijum-bromida (Sigma-Aldrich, Nemačka) i komprimuje u tablete pod pritiskom od 11 t, u trajanju oko jedan minut, pomoću Graseby Specac model: 15,011. Spektri su dobijeni u rasponu talasnog broja od 4000–400 cm⁻¹, na 25 °C i na 4 cm⁻¹ rezolucije spektra.

Bubrenje hidrogelova

Bubrenje hidrogelova bez imobilisane lipaze je praćeno gravimetrijski u puferkom rastvoru pH 6,80±0,01 (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, Analytika Ltd., Češka Republika) i na temperaturi od 37 °C. Nakon potapanja kserogelova merena je masa hidrogelova u određenim vremenskim intervalima. Stepenn bubrenja je računat prema sledećoj jednačini [19]:

$$q = W_t/W_0 \quad (1)$$

gde je W_0 masa suvog uzorka, a W_t masa nabubrela hidrogela u trenutku t .

Veličina pora je izračunata iz rezultata bubrenja primenom teorije ravnotežnog bubrenja [19]:

$$\xi = V_{2,s}^{-1/3} \left(\frac{2C_n \bar{M}_c}{M_r} \right)^{1/2} l \quad (2)$$

gde je $v_{2,s}$ zapreminski udeo polimera u nabubreloom stanju, M_r molska masa osnovne strukturne jedinice od kojih je polimerni lanac sastavljen, M_c molska masa polimernih lanaca između dve tačke umreženja, C_n je Florijev karakterističan odnos [20] koji definiše konformaciju polimera i konstantan je za dati sistem polimer–rastvarač, l dužina C–C veze ($1,54 \text{ \AA} = 1,54 \times 10^{-10} \text{ m}$) [21].

Dinamičko–mehanička svojstva hidrogelova

Dinamičko–mehanička svojstva hidrogelova ispitivana su na mehaničkom spektrometru Rheometrics 605. Korišćena je geometrija paralelnih ploča prečnika 25 mm. Hidrogelovi su izloženi konstantnom naponu na smicanje od 25% pri promeni frekvencije u intervalu od 0,1 do 100 rad/s. Određen je moduo sačuvane energije, G' , hidrogelova nabubrelih do stanja ravnoteže u puferu pH $6,80 \pm 0,01$ na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u funkciji ugaone brzine.

Određivanje aktivnosti imobilisanog enzima

Za određivanje lipolitičke aktivnosti imobilisanog enzima korišćena je standardna Sigma metoda na emulziji maslinovog ulja [22], a aktivnost je izražena u internacionalnim jedinicama, gde se jedna IU jedinica definiše kao količina enzima potrebna da pod tačno određenim uslovima (pH 7,77 i $37 \text{ }^\circ\text{C}$) oslobodi $1 \text{ } \mu\text{mol}$ slobodnih masnih kiselina u minuti. Prethodno sintetisani kserogelovi bez enzima ostavljeni su da bubre u rastvoru pH vrednosti $7,00 \pm 0,01$ i koncentracije enzima $1,0 \text{ mg}_{\text{enz}}/\text{mL}$ rastvora, na različitim temperaturama: 5, 25 i $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Aktivnost imobilisane lipaze je izražena po jedinici

mase imobilizata ($\text{IU}/\text{g}_{\text{suvog spraešenog uzorka}}$) ili kao specifična aktivnost, SA_{IE} ($\text{IU}/\text{mg}_{\text{enz}}$) koja se izračunava prema jednačini:

$$SA_{\text{IE}} = \frac{A_{\text{IE}}}{m_{\text{enz}}} \quad (3)$$

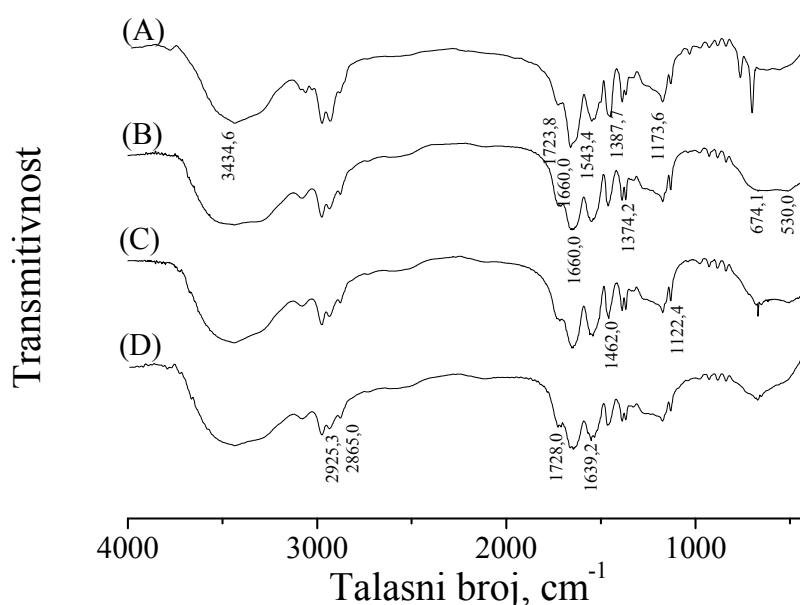
gde je A_{IE} aktivnost imobilisanog enzima, m_{enz} masa vezanog enzima po gramu suvog spraešenog uzorka ($\text{mg}_{\text{enz}}/\text{g}$).

REZULTATI I DISKUSIJA

Na slici 1 su prikazani FT-IR spektri sintetisanih hidrogelova sa i bez ugrađene PAM.

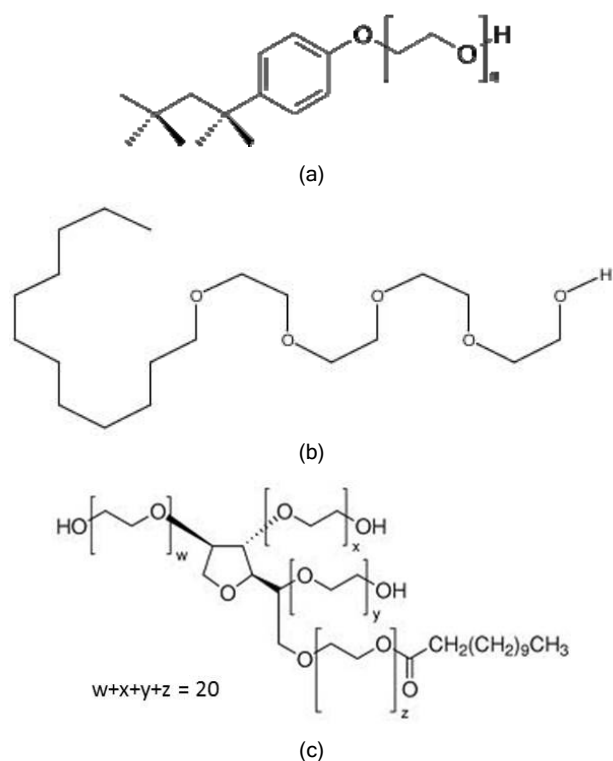
FT-IR spektri svih hidrogelova su međusobno slični. Svaki spektar pokazuje široku traku u oblasti od $3700\text{--}3100 \text{ cm}^{-1}$ što odgovara O–H vibracijama istezanja karboksilne grupe iz itakonske kiseline i N–H vibraciji istezanja NiPAAm. Pik na 1720 cm^{-1} potiče od tipične vibracije karbonilne grupe iz itakonske kiseline [23]. Karakteristične amidne trake I i II, koje potiču od NiPAAm, javljaju se oko 1650 i 1540 cm^{-1} , redom. Dve tipične trake C–H vibracija skoro istih intenziteta oko 1386 i 1379 cm^{-1} potiču od vibracija istezanja C–H veze iz $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ grupe. Traka oko 1174 cm^{-1} potiče od amidne trake III iz PNiPAAm [24]. Karakteristične trake u FT-IR spektrima hidrogelova odgovaraju apsorpcionim trakama karakterističnim za homopolimere poli(itakonsku kiselinu) i poli(*N*-izopropilakrilamid), ali su pomerene u odnosu na talasne brojeve čistih polimera zbog reakcije umrežavanja i obrazovanja hidrogela.

Na spektrima B, C i D na slici 1 uočavaju se karak-



Slika 1. FT-IR spektri sintetisanih hidrogelova 90/10/2 bez ugrađene PAM (A) i sa 5,0 mas% Triton X-100 (B), Brij 30 (C) i Tween 80 (D).
Figure 1. FT-IR spectra of hydrogels 90/10/2 without incorporated surfactant (A) and with 5.0 mass% of Triton X-100 (B), Brij 30 (C) and Tween 80 (D).

teristične apsorpcione trake za PAM, što je potvrda njihove ugradnje u matricu hidrogela. Trake na 1600, 1374, 674 i 530 cm^{-1} se mogu pripisati C–C vibracijama istezanja grupa iz Triton X-100. Traka na 1384 cm^{-1} se odnosi na CH_3 simetrične deformacije Triton X-100 (slika 1, spektar B) [25,26]. FT-IR spetar sa ugrađenim Brij 30 (slika 1, spektar C) pokazuje jaku apsorpcionu traku na 1122 cm^{-1} koja se pripisuje C–O istezanju etarske veze. Slaba traka na 1070 cm^{-1} potiče od istezanja O–H grupe alkohola. Slaba apsorpcija na 1462 cm^{-1} se pripisuje C–C grupi iz Brij 30. Apsorpciona traka srednje jakog intenziteta na 3050–2800 cm^{-1} se može pripisati C–H vibraciji istezanja metilenske i metil grupe. Široki pojas u oblasti 3700–3100 cm^{-1} je karakteristika krajnje hidroksilne grupe iz Brij 30 [27,28]. Karakteristična traka za Tween 80 se javlja na 2925 cm^{-1} , a odnosi se na vibracije istezanja CH_2 grupa (slika 1, spektar D) [29]. Dalje, karakteristične apsorpcione trake na 3448 i 1639 cm^{-1} se odnose na vibracije istezanja O–H grupe, dok se trake na 2865 i 1728 cm^{-1} odnose na C–H i C–O vibracije istezanja, redom. Široka apsorpciona traka u rasponu od 3700–3100 cm^{-1} ukazuje na prisutvo hidroksilnih grupa [30,31]. Na slici 2 dat je prikaz strukturnih formula PAM koje su korišćene u ovom radu.

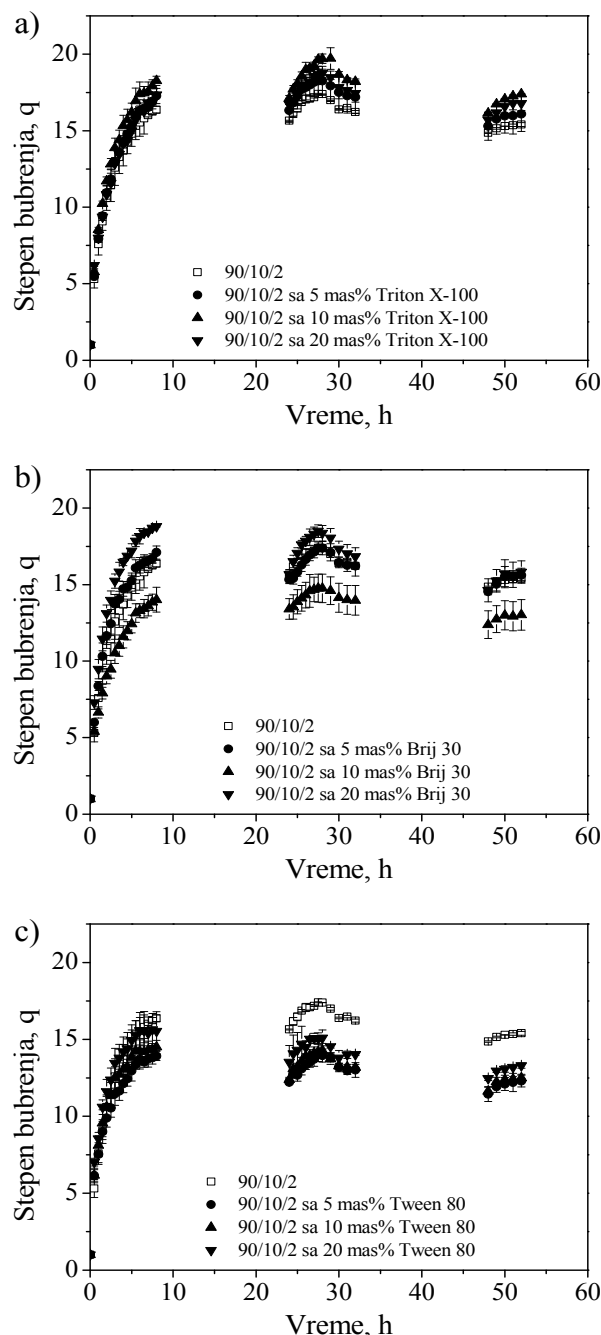


Slika 2. Strukturna formula a) Triton X-100, b) Brij 30 i c) Tween 80.

Figure 2. Structural formulae of a) Triton X-100, b) Brij 30 and c) Tween 80.

Bubrenje uzoraka praćeno je na 37 °C u rastvoru čija je pH vrednost iznosila 6,80±0,01. Svi rezultati

predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja (slika 3). Standardna devijacija svih merenja je bila manja od ±5%, što ukazuje na veoma dobru reproduktivnost rezultata. Merena je masa hidrogelova do uspostavljanja ravnoteže kada prestaje upijanje rastvora, a zatim je određen ravnotežni stepen bubrenja, kao i veličina pora (tabela 1).



Slika 3. Stepni bubrenja hidrogelova bez lipaze, za uzorak bez PAM i uzorak sa ugrađenim PAM: a) Triton X-100, b) Brij 30 i c) Tween 80, na 37 °C bubrenih do ravnoteže na pH 6,80.

Figure 3. The degree of swelling of hydrogels without lipase, for the sample with no surfactant added and for the samples with different surfactants: a) Triton X-100, b) Brij 30 and c) Tween 80, at 37 °C swollen to equilibrium in pH 6.80.

Tabela 1. Veličina pora za hidrogelove 90/10/2 na 37 °C i prinos aktivnosti lipaze (uslovi uklapanja lipaze: koncentracija rastvora 1,0 mg_{enz}/mL pufera pH 7,00±0,01; temperatura, 5 °C)
Table 1. Mesh size of hydrogels 90/10/2 at 37 °C and the lipase activity yield (lipase binding conditions: solution concentration of 1.0 mg_{enz}/mL of buffer solution pH 7.00±0.01; temperature, 5 °C)

Uzorak	ξ / nm	Y / %
90/10/2	1,04	24,1
90/10/2 sa 5 mas% Triton X-100	1,34	17,6
90/10/2 sa 10 mas% Triton X-100	1,21	17,8
90/10/2 sa 20 mas% Triton X-100	1,16	18,3
90/10/2 sa 5 mas% Brij 30	1,05	22,1
90/10/2 sa 10 mas% Brij 30	1,13	22,8
90/10/2 sa 20 mas% Brij 30	1,13	22,2
90/10/2 sa 5 mas% Tween 80	0,89	22,1
90/10/2 sa 10 mas% Tween 80	0,87	23,2
90/10/2 sa 20 mas% Tween 80	0,95	23,9

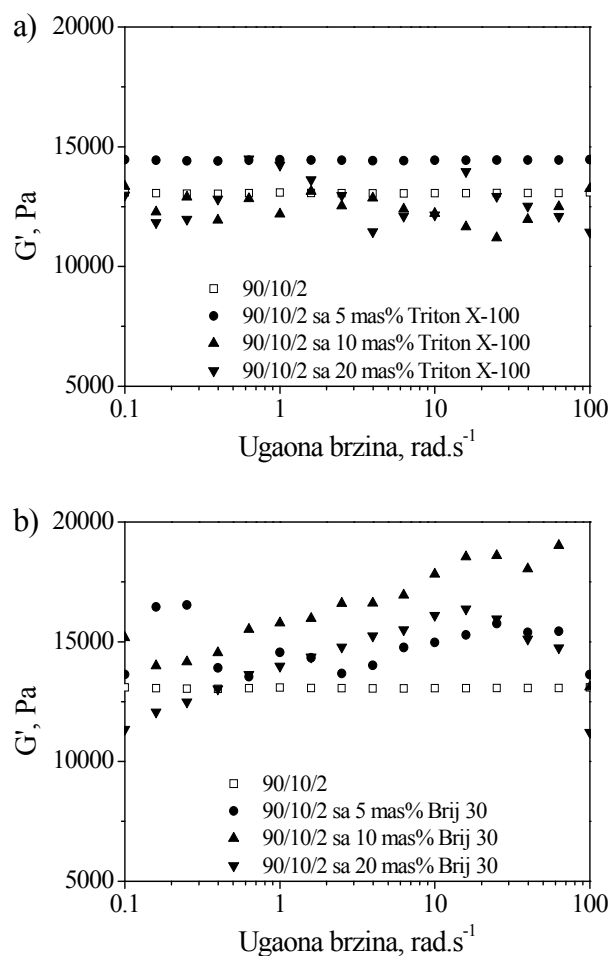
Parametri mreže su određeni primenom teorije ravnotežnog bubrenja. Korišćenjem jednačine (2) izračunate su veličine pora za sintetisane uzorke i prikazane su u tabeli 1.

Prema veličini pora, svi hidrogelovi su podeljeni u nekoliko kategorija: mikroporozni, makroporozni, neporozni i superporozni [19]. Hidrogelovi sintetisani u ovom radu pripadaju grupi neporoznih hidrogelova (tabela 1). Dodatak PAM utiče na porast veličine pora hidrogelova. Jedino dodatak Tween 80 ima suprotan, ali neznatan uticaj. Takođe, tokom procesa bubrenja uzoraka sa inkorporiranim Tween 80 dolazi do njihovog oštećenja.

Dinamičko–mehanička svojstva hidrogelova su ispitana na 37 °C nakon bubrenja hidrogelova u puferu pH vrednosti 6,80±0,01. Pri pH vrednosti od 6,80 obe karboksilne grupe iz kiseline su jonizovane, pa je bubrenje više izraženo, što utiče na krajnja mehanička svojstva hidrogela. Na slici 4 prikazana je zavisnost modula sačuvane energije hidrogela 90/10/2 bez ugrađene PAM, kao i hidrogelova sa ugrađenom PAM različitog sadržaja.

Iz prikazanih rezultata je utvrđeno da tip kao i koncentracija PAM koji je ugrađen u hidrogel tokom njegove sinteze utiče na vrednost modula sačuvane energije hidrogelova. Uočeno je da referentni uzorak, i uzorak hidrogela u koji je ugrađen Brij 30 imaju slična mehanička svojstva, odnosno da prisustvo Brij 30 nije pogoršalo mehanička svojstva sintetisanog uzorka hidrogela. Ovi uzorci su pokazali nešto veći moduo sačuvane energije u odnosu na uzorke u koje je ugrađen Triton X-100. Ovakva svojstva su verovatno posledica veličine molekula PAM ($M_{\text{Brij 30}} = 362,56$ g/mol, $M_{\text{Triton X-100}} = 646,85$ g/mol, $M_{\text{Tween 80}} \cong 1200$ g/mol) koji pri inkorporiranju utiču na formiranje polimerne mreže, što za rezultat ima nešto lošija svojstva ovih uzoraka. Hidroge-

lovi sintetisani u prisustvu Tween 80 su imali izuzetno loša mehanička svojstva nakon bubrenja u rastvoru pH vrednosti 6,80, pa zbog toga nisu prikazani.



Slika 4. Modul sačuvane energije, G' , u funkciji ugaone brzine za 90/10/2 hidrogelove bez ugrađene PAM i sa a) Triton X-100 i b) Brij 30, bubrenih do ravnoteže u pH 6,80±0,01 na 37 °C.

Figure 4. Shear storage modulus, G' , versus angular velocity for 90/10/2 hydrogels without incorporated surfactant and with a) Triton X-100 and b) Brij 30 being incorporated, swollen to equilibrium in pH 6.80±0.01 at 37 °C.

Da bi se osiguralo maksimalno moguće vezivanje enzima za nosač uzorci su ostavljeni da bubre u rastvorima na temperaturi od 5 °C do dostizanja ravnotežnog stepena bubrenja. Rezultati aktivnosti sintetisanih biokatalizatora su prikazani u tabeli 1.

Kako hidrogelovi na bazi NiPAAm pokazuju LCST vrednost na oko 32 °C [32], može se pretpostaviti da će na temperaturi od 5 °C biti omogućeno olakšano uklapanje lipaze u hidrogel, kao posledica povećanog bubrenja hidrogelova na ovoj temperaturi. Nakon uklapanja lipaze u hidrogelove, u koje je inkorporirana nejonska PAM, rezultati merenja njene aktivnosti su pokazali da dodatak PAM nije poboljšao aktivnost ovako imobili-

sane lipaze (tabela 1). To može biti posledica odsustva naelektrisanih grupa u molekulu PAM, jer promene u naelektrisanju utiču na aktivnost i strukturnu stabilnost enzima, što se može odraziti na promene u vezivanju supstrata i katalitičke efikasnosti [17]. Vrednosti iz tabele 1 pokazuju da najveći procenat specifične aktivnosti lipaze i prinosa aktivnosti pokazuje referentni uzorak koji je sintetisan bez prisustva PAM. Takođe, neznatni gubici u enzimskoj aktivnosti se javljaju i sa porastom sadržaja PAM u sintetisanim hidrogelovima. Može se zaključiti da dodatak nejonskih PAM nije uticao na porast katalitičke aktivnosti lipaze, a da je pad u prinosu aktivnosti za sve ispitivane uzorke bio neznatan.

ZAKLJUČAK

Sintetisani su hidrogelovi *N*-izopropilakrilamida i itakonske kiseline u prisustvu nejonskih površinski aktivnih materija da bi se ispitaio njihov uticaj na aktivnost imobilisane lipaze iz *Candida rugosa*. Utvrđeno je da dodatak PAM utiče na porast veličine pora hidrogelova i na mehanička svojstva. Dovoljno dobra dinamičko–mehanička svojstva pokazao je referentni uzorak i uzorak u koji je ugrađen Brij 30. Najveći procenat specifične aktivnosti lipaze kao i prinosa aktivnosti je pokazao uzorak hidrogela koji je sintetisan u odsustvu PAM. Dodatak PAM nije poboljšao aktivnost imobilisane lipaze što bi moglo da bude posledica odsustva naelektrisanih grupa u molekulu PAM.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije za finansijsku podršku ovom radu u okviru projekta br. III 46010, „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenti hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“ kao i projekta br. 172062 „Sinteza i karakterizacija novih funkcionalnih polimera i polimernih nanokompozita“.

LITERATURA

- [1] S.S. Kanwar, M. Gupta, R. Gupta, R.K. Kaushal, S.S. Chimni, Properties of hydrogel-entrapped lipase of thermophilic *Pseudomonas aeruginosa* BTS-2, *Indian J. Biotechnol.* **5** (2006) 292–297
- [2] V.M. Balcao, A.L. Paiva, F.X. Malcata, Bioreactors with immobilized lipases: State of the art, *Enzyme Microb. Technol.* **18** (1996) 392–416
- [3] A.L. Pavia, V.M. Balcao, F.X. Malcata, Kinetics and mechanism of reactions catalyzed by immobilized lipase, *Enzyme Microb. Technol.* **27** (2000) 187–204
- [4] G. Bayramoglu, Y. Kacar, A. Denizli, A.M. Yakup, Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix, *J. Food Eng.* **52** (2002) 367–374
- [5] M.Y. Arica, A. Denizli, B. Salih, E. Piskin, V. Hasirci, Catalase adsorption onto Cibacron Blue F3GA and Fe(III) derivatized P(HEMA) membranes and application to a continuous system, *J. Memb. Sci.* **129** (1997) 65–76
- [6] A.E. Ivanov, M.P. Schneider, Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis, *J. Mol. Catal. B* **3** (1997) 303–309
- [7] Q.Z.K. Zhou, X.D. Chen, Immobilization of *Bgalactosidase* on graphite surface by glutaraldehyde, *J. Food Eng.* **48** (2001) 69–74
- [8] J.L. Schmitke, C.R. Wescott, A.M. Klivanov, The Mechanistic Dissection of the Plunge in Enzymatic Activity upon Transition from Water to Anhydrous Solvents, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 3360–3365
- [9] A. Zaks, A.M. Klivanov, Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 3194–3201
- [10] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity *via* immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.* **40** (2007) 1451–1463
- [11] R.N. Mitra, A. Dasgupta, D. Das, S. Roy, S. Debnath, P.K. Das, Geometric Constraints at the Surfactant Headgroup: Effect on Lipase Activity in Cationic Reverse Micelles, *Langmuir* **21** (2005) 12115–12123
- [12] A. Shome, S. Roy, P.K. Das, Nonionic Surfactants: A Key to Enhance the Enzyme Activity at Cationic Reverse Micellar Interface, *Langmuir* **23** (2007) 4130–4136
- [13] D. Das, S. Roy, R.N. Mitra, A. Dasgupta, P.K. Das, Head-Group Size or Hydrophilicity of Surfactants: The Major Regulator of Lipase Activity in Cationic Water-in-Oil Microemulsions, *Chem. Eur. J.* **11** (2005) 4881–4889
- [14] D. Das, P.K. Das, Superior Activity of Structurally Deprived Enzyme-Carbon Nanotube Hybrids in Cationic Reverse Micelles, *Langmuir* **25** (2009) 4421–4428
- [15] D. Das, S. Roy, S. Debnath, P.K. Das, Surfactant-Stabilized Small Hydrogel Particles in Oil: Hosts for Remarkable Activation of Enzymes in Organic Solvents, *Chem. Eur. J.* **16** (2010) 4911–4922
- [16] G.L. Russell, L.N. Britton, Use of Certain Alcohol Ethoxylates to Maintain Protease Stability in the Presence of Anionic Surfactants, *J. Surfact. Deterg.* **5** (2002) 5–10
- [17] E. Hoshino, A. Tanaka, Enhancement of Enzymatic Catalysis of *Bacillus amyloliquefaciens* α -Amylase by Nonionic Surfactant Micelles, *J. Surfact. Deterg.* **6** (2003) 299–303
- [18] N. Milašinović, N. Milosavljević, J. Filipović, Z. Knežević-Jugović, M. Kalagasidis Krušić, Synthesis, characterization and application of poly(*N*-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels as supports for lipase immobilization, *React. Funct. Polym.* **70** (2010) 807–814
- [19] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50** (2000) 27–46
- [20] N. Milašinović, M. Kalagasidis Krušić, Z. Knežević-Jugović, J. Filipović, Hydrogels of *N*-isopropylacrylamide copolymers with controlled release of a model protein. *Int. J. Pharm.* **383** (2010) 53–61

- [21] X. Liu, G. Fussell, M. Marcolongo, A.M. Lowman, Characterization of Associating Hydrogels of Poly(vinyl alcohol) and Poly(vinyl pyrrolidone), *J. Appl. Polym. Sci.* **112** (2009) 541–549
- [22] N.W. Tietz, E.A. Fiereck, A specific method for serum lipase determination, *Clin. Chim. Acta* **13** (1966) 352–358
- [23] J. Mudassir, N.M. Ranjha, Dynamic and equilibrium swelling studies: crosslinked pH sensitive methyl methacrylate-co-itaconic acid (MMA-co-IA) hydrogels, *J. Polym. Res.* **15** (2008) 195–203
- [24] Q. Aixiang, L.U. Mangeng, L. Qunfeng, Z. Ping, Synthesis and characterization of thermo-sensitive poly(*N*-isopropylacrylamide) hydrogel with fast response rate, *Front. Chem. China* **2** (2007) 135–139
- [25] G.H.M. Saeed, S. Radiman, S.S. Gasaymeh, H.N. Lim, N.M. Huang, Mild Hydrothermal Synthesis of Ni–Cu Nanoparticles, *J. Nanomater.* **1** (2010) 1–5
- [26] N. Kimura, J. Umemura, S. Hayashi, Polarized FT-IR Spectra of Water in the Middle Phase of Triton X100-Water System, *J. Colloid Interface Sci.* **182** (1996) 356–364
- [27] H. Lim, A. Kassim, N. Huang, M.A. Yarmo, S. Yeong, P. Khiew, W. Chiu, One-Pot Preparation of Three-Component Oil-in-Water High Internal Phase Emulsions Stabilized by Palm-Based Laureth Surfactants and Their Moisturizing Properties, *Colloid J.* **71** (2009) 660–667
- [28] H.N. Lim, A. Kassim, N.M. Huang, M.A. Yarmo, P.S. Khiew, W.S. Chiu, Preparation and Characterization of Brushite Crystals Using High Internal Phase Emulsion, *Colloid J.* **71** (2009) 793–802
- [29] S. Peng, L. Zheng, D. Fuxin, Y. Jiangang, L. Xiang, Surfactant Enhanced Electroremediation of Phenanthrene, *Chinese J. Chem. Eng.* **11** (2003) 73–78
- [30] Y. Khan, S.K. Durrani, M.M.J. Ahmad, M.R. Khan, S. Firdous, Low temperature synthesis of fluorescent ZnO nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* **257** (2010) 1756–1761
- [31] X. Zhang, H. Yin, X. Cheng, H. Hu, Q. Yu, A. Wang, Effects of various polyoxyethylene sorbitan monooleils (Tweens) and sodium dodecyl sulfate on reflux synthesis of copper nanoparticles, *Mater. Res. Bull.* **41** (2006) 2041–2048
- [32] M. Kalagasidis Krušić, M. Ilić, J. Filipović, Swelling behavior and paracetamol release from poly(*N*-isopropylacrylamide itaconic acid) hydrogels, *Pol. Bull.* **63** (2009) 197–211.

SUMMARY

IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *Candida rugosa* INTO COPOLYMER HYDROGELS OF POLY(*N*-ISOPROPYLACRYLAMIDE-CO-ITACONIC ACID) SYNTHESIZED IN THE PRESENCE OF SURFACTANTS

Nikola Z. Milašinović, Nedeljko B. Milosavljević, Jovanka M. Filipović, Zorica D. Knežević-Jugović, Melina T. Kalagasidis Krušić

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

To overcome the problems of free enzyme application as catalysts in chemical reactions, *i.e.*, high costs of isolation and purification processes, high sensitivity to process conditions, insufficient enzyme stability etc., different immobilization techniques need to be used. Immobilization to/within solid support improves enzyme stability decreasing its denaturation. This paper deals with hydrogels of *N*-isopropylacrylamide and itaconic acid with incorporated nonionic surfactants (Triton X-100, Brij 30 and Tween 80) synthesized in distilled water at room temperature by free radical polymerization. These hydrogels were used as supports for immobilization of enzyme, lipase from *Candida rugosa* by post-entrapment method. The aim was to investigate the effect of the non-ionic surfactants on the lipase binding capacity, as well as on its hydrolytic activity. In order to characterize the obtained hydrogels, FT-IR analysis has been performed. Further, the swelling behaviour of these samples in buffer solution of pH 6.80 has been investigated. The dynamic-mechanical properties of hydrogels have been studied, too. The immobilized lipase showed somewhat reduced hydrolytic activity, compared to the activity of free lipase as well as in comparison to the lipase immobilized to the reference sample (sample synthesized under the same polymerization conditions, but in the absence of surfactants). It was concluded that the addition of surfactants increased the hydrogel mesh size. The surfactant addition did not affect the dynamic-mechanical properties of the investigated hydrogels. The largest percentage of specific activity and yield of activity were presented by the reference sample, too. It is obvious that the absence of surfactants charged groups has no influence on the lipase binding capacity, and the obtained activity yields are to be expected.

Keywords: Non-ionic surfactants • Hydrogels • *N*-Isopropylacrylamide • Itaconic acid • Lipase activity